

## ⑫ 公開特許公報(A) 平4-197182

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)7月16日

C 12 N 15/57  
 C 11 D 3/386  
 C 12 N 9/54  
 //(C 12 N 15/57  
 C 12 R 1:07)  
 (C 12 N 9/54  
 C 12 R 1:07)

ZNA

7614-4H  
 7823-4B

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 9 (全17頁)

⑮ 発明の名称 アルカリプロテアーゼY a酵素をコードするDNA及び該DNAを用いたアルカリプロテアーゼY aの製造方法

⑯ 特 願 平2-327110

⑰ 出 願 平2(1990)11月28日

⑱ 発 明 者 戸 部 聖 一 神奈川県中郡二宮町山西457  
 ⑱ 発 明 者 大 寺 基 靖 神奈川県平塚市日向岡2-2-34  
 ⑱ 発 明 者 浅 井 芳 男 神奈川県中郡二宮町百合が丘2-23-3  
 ⑲ 出 願 人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号  
 ⑳ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外8名

## 明 細 書

1. 発明の名称 アルカリプロテアーゼY a酵素  
 をコードするDNA及び該DNA  
 Aを用いたアルカリプロテアー  
 ゼY aの製造方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) アルカリプロテアーゼY a酵素をコードする  
 DNA。

(2) 下記のアミノ酸配列で特定される請求項1記  
 載のDNA。

1 20  
 AsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAspValAlaGlnAsnAsnTyrGlyLeuTyr  
 21 40  
 GlyGlnGlyGlnLeuValAlaValAlaAspThrGlyLeuAspThrGlyArgAsnAspSer  
 41 60  
 SerMetHisGluAlaPheArgGlyLysIleThrAlaLeuTyrAlaLeuGlyArgThrAsn  
 61 80  
 AsnAlaSerAspProAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlySerValLeuGlyAsnAla  
 81 100  
 LeuAsnLysGlyMetAlaProGlnAlaAsnLeuValPheGlnSerIleMetAspSerSer  
 101 120  
 GlyGlyLeuGlyGlyLeuProSerAsnLeuAsnThrLeuPheSerGlnAlaTrpAsnAla  
 121 140  
 GlyAlaArgIleHisThrAsnSerTrpGlyAlaProValAsnGlyAlaTyrThrAlaAsn

141 160  
 SerArgGlnValAspGluTyrValArgAsnAsnAspMetThrValLeuPheAlaAlaGly  
 161 180  
 AsnGluGlyProAsnSerGlyThrIleSerAlaProGlyThrAlaLysAsnAlaIleThr  
 181 200  
 ValGlyAlaThrGluAsnTyrArgProSerPheGlySerIleAlaAspAsnProAsnHis  
 201 220  
 IleAlaGlnPheSerSerArgGlyAlaThrArgAspGlyArgIleLysProAspValThr  
 221 240  
 AlaProGlyThrPheIleLeuSerAlaArgSerSerLeuAlaProAspSerSerPheTrp  
 241 260  
 AlaAsnTyrAsnSerLysTyrAlaTyrMetGlyGlyThrSerMetAlaThrProIleVal  
 261 280  
 AlaGlyAsnValAlaGlnLeuArgGluHisPheIleLysAsnArgGlyIleThrProLys  
 281 300  
 ProSerLeuIleLysAlaAlaLeuIleAlaGlyAlaThrAspValGlyLeuGlyTyrPro  
 301 320  
 SerGlyAspGlnGlyTrpGlyArgValThrLeuAspLysSerLeuAsnValAlaTyrVal  
 321 340  
 AsnGluAlaThrAlaLeuAlaThrGlyGlnLysAlaThrTyrSerPheGlnAlaGlnAla  
 341 360  
 GlyLysProLeuLysIleSerLeuValTrpThrAspAlaProGlySerThrThrAlaSer  
 361 380  
 TyrThrLeuValAsnAspLeuAspLeuValIleThrAlaProAsnGlyGlnLysTyrVal  
 381 400  
 GlyAsnAspPheSerTyrProTyrAspAsnAsnTrpAspGlyArgAsnAsnValGluAsn

401 ValPheIleAsnAlaProGlnSerGlyThrTyrIleIleGluValGlnAlaTyrAsnVal  
421 433  
ProSerGlyProGlnArgPheSerLeuAlaIleValHis

(3) 下記のDNA配列で特定される請求項1記載のDNA。

1 80  
AATGATGTAGCAAGAGGATAGTAAAGCTGATGTTGCACAAAACAATTACGGATTATAT  
61 120  
GGACAAGGTCAACTAGTTCAGTAGCGGACACAGCTTAGATACAGGTCGTAACGATAGT  
121 180  
TCTATGCATGAAGCATTCGCCGGAAAAATCACAGCTCTTTACGCTTAGGAAGAATAAT  
181 240  
AATCGAGTGATCCGAATGGCGTGCACACATGTAGCAGGTTCTGTACTTGCTAATGCT  
241 300  
TTAAATAAGGAATGGCTCCGCAAGCTAACTAGTCTTCCAATCTATTATGCATAGCAGC  
301 360  
GGAGGATTAGTGGCTTACCATCGAAGCTAAATACGTTATTTAGTCAAGCTTGAATGCT  
361 420  
GGAGCAAGAATTCATACTAACTCTTGGGAGGCCAGTAAATGGAGGTACACTGCTAAC  
421 480  
TCGAGACAAGTGGATGAGTATGTTGAAATAATGATATGACGGTACTTTTTCAGCTGGT  
481 540  
AATGAAGGTCTAATTCAGGAACAATTAGTGTCCAGGTACAGGAAAAATGCTATTACG

541 600  
GTCCGCCCAACGGAAACTATCGCCCAAGCTTCGGTTCGATAGCAGATAACCCAAATCAT  
601 660  
ATTGCACAATTTTCATCGACAGGAGCTACGAGCGATGCACGAATTAAGCCTGACGTAACA  
661 720  
GCTCCTGGAACATTTATTTATACGACGTTCTTCTTACCTCCAGACTCTTCGTTTTCG  
721 780  
GCGAATTATAACAGTAAATACGCTATATCGCGGTACCTCCATGGGACACCTATTGTT  
781 840  
GCAGGGAAATGTCGGCAATTACCTGAGCATTATATAAAAAATAGAGGTATTACTCCTAAG  
841 900  
CCTTCTTTAATAAAAGCTGCACCTTATCGCTGGTGGTACTCATGTTGGTTAGGATATCCT  
901 960  
ACTGCTGACCAAGGCTCGGGGGCTGTTACTCTAGATAAATCGTTAAATGTAGCCTATGTC  
961 1020  
AATGAAGCAACTGCATTAGCCACAGGACAAAAAGCAACGTATTCTTCCAAGCACAGCG  
1021 1080  
GGTAAACCTTTAAAAATCTCGTTAGTATGGACAGATGCTCCTGGAAGTACAACCTGATCT  
1081 1140  
TATACACTAGTTAATGATTAGATCTAGTTATTACTGCTCCGAATGGACAAAAATGTGA  
1141 1200  
GGAAATGATTTTATGTTATCCTTATGATAAATACTGGCATGCTCCCAACATCTTGAGAAC  
1201 1260  
GTATTTATAAAGCTCCGCAATCTGGAACGTATATAATTGAGCTTCAACCGTATAATGTA  
1261 1299  
CCATCTCCCCACACCGTTTCTCACTACCTATCGTACAT

- (4) 請求項1又は2のDNAの上流に、中性またはアルカリプロテアーゼ遺伝子の転写及び翻訳に関する5'末端の非翻訳領域又はアミラーゼ遺伝子の転写及び翻訳に関する5'末端の非翻訳領域を有する請求項1記載のDNA。
- (5) 請求項1～4のいずれか1項に記載のアルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>酵素をコードするDNAを含有するプラスミドDNA。
- (6) 請求項5記載のプラスミドDNAを導入した微生物。
- (7) 微生物がバチルス属細菌である請求項5記載の微生物。
- (8) 請求項6又は7記載の微生物を培養することにより培養物からアルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>を採取することを特徴とするアルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>の製造方法。
- (9) 微生物がバチルス属細菌であり、中性で培養する請求項8記載の製造方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 〔産業上の利用分野〕

本発明は耐アルカリ性及び耐界面活性剤性に優れ、洗浄力の改善に寄与するY<sub>a</sub>酵素（特開昭61-280278号）の遺伝子をコードするDNA断片及び核断片を含むプラスミドを導入した微生物を用いてY<sub>a</sub>酵素を製造する方法に関する。

#### 〔従来の技術〕

耐アルカリ性及び耐界面活性剤性に優れたY<sub>a</sub>酵素は、通常のアルカリプロテアーゼが失活するような高pH液体洗浄剤に配合した場合でも、蛋白質分解活性を保持し、洗浄力の向上に寄与する能力を有している。Y<sub>a</sub>酵素は、バチルス・エスピ― Y株（*Bacillus* sp. Y）（微工研菌寄第8088号）を培養することにより、その培養物に見いだすことができるが、通常の培養を行なってもその生産量は低くこの状態では工業的レベルでの計算は困難と言わざるをえない。

一般に、バチルス属が生産するアルカリプロテアーゼの生産性を向上させるためには、化学物質、

紫外線照射等による変異処理等を用いた菌株の育種や培養条件の改良等を行ない、生産性を向上させることが試みられている。ところが菌株または製造物の種類によってその効果の程度は様々であり、偶然性によるところが大きい。そこで合理的かつ理論的に生産性の高まる製造方法、すなわち遺伝子組換え技術を用いたY<sub>a</sub>酵素の製造方法が望まれている。

また好アルカリ性細菌であるバチルス・エスピー Y株は、アルカリ性の培地で培養を行なうために、栄養源の変質や培養液の着色等の様々な不都合が生じる。そのため中性付近での培養が可能になれば、培養工程や精製工程の簡略化が可能となり工業生産において有利である。

〔発明が解決しようとする課題〕

Y<sub>a</sub>酵素の生産性を高めるためには、バチルス・エスピー Y株を用いた従来の変異処理法を主体とした育種法では不十分な点がある。そこで本発明は、遺伝子組換え技術を用いることによりY<sub>a</sub>酵素の生産性の向上に利用できるY<sub>a</sub>酵素をコー

ドする遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いてY<sub>a</sub>酵素の生産性を向上させる方法を提供することを目的とする。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、Y<sub>a</sub>酵素生産菌よりY<sub>a</sub>酵素遺伝子を単離し、その塩基配列を決定することにより、又Y<sub>a</sub>酵素遺伝子即ちY<sub>a</sub>酵素のプロモーターからシグナルペプチド、前駆体領域、成熟酵素領域及びターミネーターまでをコードする領域を含むDNA断片を適当な宿主菌に導入することによりY<sub>a</sub>酵素を生産し、さらにはプロモーター領域（以下、プロモーター領域とは一般的に大腸菌等で定義されるコンセンサス配列に加えて構造遺伝子の直前にあるShine-Dalgarno配列を含む転写及び翻訳に關与する5'末端非翻訳領域とする。）を、その宿主菌において効率よく作動するような他の遺伝子由来のプロモーター領域に置換することによりY<sub>a</sub>酵素を高生産化できることを見出し、該知見に基づいて完成された。

本発明に係るY<sub>a</sub>酵素遺伝子は、第1図に示す

塩基配列とアミノ酸配列を有する。この配列中には、転写、翻訳開始に関する領域、前駆体領域と成熟蛋白領域とが含まれ、このうち、203残基目～635残基目のアミノ酸配列が成熟タンパク質に相当し、本発明において重要である。つまり、本発明によれば上記203～635（成熟酵素領域）残基の上流に位置するプロモーター領域、分泌のための領域等を公知の手段により他の蛋白質をコードする遺伝子のそれらと置換し、より効率的にY<sub>a</sub>酵素を製造することができる。この際、本発明では、203～635残基の上流に位置するプロモーター領域をバチルス属細菌で強力に機能するようなプロモーター領域をもった遺伝子、例えばバチルス属細菌由来の中性又はアルカリプロテアーゼ又はアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域で置換したDNAをプラスミドに導入し、これをバチルス属細菌に導入することによって、中性領域（pH6～8近辺）で培養することによりY<sub>a</sub>酵素を効率的に製造することができる。

第1図に示す塩基配列は、Y<sub>a</sub>酵素遺伝子のク

ローニングにより決定できた。ここで用いるクローニング法としては、Y<sub>a</sub>酵素をコードする遺伝子をクローニングできる方法であればいかなる方法でも構わないが、例えば下記に示すような大腸菌を宿主菌として、バチルス・エスピー Y株染色体のDNA断片を保持する組換え体を作製し、Y<sub>a</sub>酵素をコードする遺伝子と相補的なDNAを利用したハイブリダイゼーション法によってY<sub>a</sub>酵素遺伝子をクローニングすることができる。

Y<sub>a</sub>酵素生産菌、例えばバチルス・エスピー Y株からY<sub>a</sub>酵素を精製し、必要に応じてトリプシン消化等により得られたY<sub>a</sub>酵素断片等を用いてアミノ酸配列を決定し、このうち好適なアミノ酸配列に対応する一本鎖オリゴヌクレオチドをDNAプローブとして合成することができる。

次に、Y<sub>a</sub>酵素生産菌より染色体DNAを抽出する。用いる菌株としてはY<sub>a</sub>酵素を生産する菌株であればいかなる菌株でも構わないが、例えばバチルス・エスピー Y株があげられる。染色体DNAを抽出する方法としてはサイトウーミウラ

の方法 (Biochim. Biophys. Acta. 72, 619 (1983)) 等によって調製することができる。

このように取得した染色体DNAをEcoRI、XbaIなどの制限酵素を用いて断片化し、アガロースゲル電気泳動に供し、合成したDNAプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション (Molecular Cloning, 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 9.31 (1989)) を行ない、DNAプローブの相補性及びその相補するDNA断片の大きさを特定する。染色体DNAを消化する制限酵素は、他の制限酵素であっても構わない。DNAプローブは $\gamma$ - $^{32}$ P-ATPを用いることによって標識することができる。

次に特定したDNA断片を回収する。回収方法はどのような方法でも構わないが、例えばDBA3ペーパー法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6.24 (1989)) を用いてそのDNA断片を回収することができる。

DNAを抽出し、前記と同様にサザンハイブリダイゼーションを行ない、DNAプローブと相補する組換えプラスミドを保持する菌株を選択することによりY<sub>a</sub>酵素遺伝子を保持する形質転換株を取得することができる。

取得したY<sub>a</sub>酵素遺伝子の塩基配列はSangerらの方法等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)) により決定することができる。さらにその塩基配列によってY<sub>a</sub>酵素のアミノ酸配列を解明することができる。

本発明のDNA配列は天然のDNA配列のみに限定されるのではなく、本発明により明らかにされたY<sub>a</sub>酵素のアミノ酸配列をコードする他のDNA配列も含まれる。また、本酵素の特徴である耐界面活性剤性及び耐アルカリ性等のY<sub>a</sub>酵素の機能を損なわない限りにおいて本発明のDNA配列及びアミノ酸配列に人為的な挿入、欠失、置換等を行なうことにより改造することは可能であり、本発明にはそのような変異遺伝子及び改質酵素蛋白質も含まれる。

さらに回収したDNA断片とベクターDNAとを連結する。そのDNA断片を消化した制限酵素と同じ制限酵素認識部位を持つベクターDNA、例えばpBR328、pUC118などを同一の制限酵素で消化する。さらにアルカリファスファターゼで脱磷酸したのち同一の制限酵素認識部位を有するDNA断片とT4リガーゼにより連結することができる。この反応物をHanahanの方法 (DNA Cloning Vol.1 IRL Press, p.109 (1985)) に準じて大腸菌に導入することができる。

形質転換を行なった菌株の中からY<sub>a</sub>酵素遺伝子を保持する菌株を選択する。選択方法にはコロニーハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.90 (1989)) 等、様々な方法を用いることができるが、例えば形質転換を行なった各菌株よりアルカリ-SDS法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.25 (1989)) を用いて

Y<sub>a</sub>酵素遺伝子を発現させるために、Y<sub>a</sub>酵素遺伝子を適当な宿主菌に導入する。宿主菌としては、大腸菌、バチルス属、シェウドモナス (Pseudomonas) 属等の細菌、アスペルギルス (Aspergillus) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、カンジダ (Candida) 属等の微生物があげられるが他の宿主菌でも構わない。例えばバチルス属を宿主菌とした場合、Y<sub>a</sub>酵素遺伝子を分断することなく消化する制限酵素と同じ制限酵素でベクタープラスミド、例えばpUB110、pBD84等を消化し、これとY<sub>a</sub>酵素遺伝子をT4リガーゼを用いて連結させる。この反応物をプロトプラスト法 (S. Chang, Mol. Gen. Genet. 188, 111 (1979)) を用いてバチルス属細菌に導入することができる。Y<sub>a</sub>酵素遺伝子を含むDNAを導入した宿主菌を培養し、その培養物よりY<sub>a</sub>酵素を取得する。Y<sub>a</sub>酵素の発現の確認及びその発現量はウエスタン・ブロッティング、蛋白質分解力の測定等により行なうことができる。

Y<sub>a</sub>酵素の生産性を増大させるためには、プロモーター領域を宿主菌にとって効率のよいプロモーター領域と交換して発現させることにより、生産性を増大させることができる。例えばバチルス属細菌を宿主菌とした場合には、バチルス属細菌由来の中性またはアルカリプロテアーゼ遺伝子のプロモーター領域、アミラーゼ遺伝子のプロモーター領域等が好都合である。例えばY<sub>a</sub>酵素遺伝子由来のプロモーター領域をバチルス・ライヘンホルミス(*Bacillus licheniformis*)由来のアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に交換する。そして、例えばプロモーター領域後方部分に部位特異的変異法を用いて制限酵素認識部位、例えばBclI認識部位等を作製し、制限酵素を用いたプロモーター領域の切除及びT4リガーゼを用いた連結等を行なうことによりプロモーター領域の交換を行なうことができる。さらにプロモーター領域の交換を行なったY<sub>a</sub>酵素遺伝子をバチルス・サチルス(*Bacillus Subtilis*)に導入し、培養を行なうことによりY<sub>a</sub>酵素を生産させる。これにより

もとのY<sub>a</sub>酵素遺伝子由来のプロモーター領域を用いた場合に比べて生産性を増大させることができる。

上記に示す手法によりプロモーター領域を交換したY<sub>a</sub>酵素遺伝子を含むプラスミドを保持するバチルス・サチルスを用いてY<sub>a</sub>酵素の極めて高い生産性を獲得することができる。

上記バチルス・サチルスは、上記バチルス・サチルスが生産できる培地であればいずれでもかまわないが、例えば炭素源としてグルコース、澱粉、糖蜜等、窒素源としてはペプトン、ポリペプトンS、大豆粉、コーンステイープリカー等、さらにミネラル等を含む培地を用いて温度30-40℃、50-100時間培養することができる。また培養物から陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等により、Y<sub>a</sub>酵素を精製できる。

以下に実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 〔実施例〕

##### 実施例 1

##### サザンハイブリダイゼーション

Y<sub>a</sub>酵素のN末端領域のアミノ酸配列をアブライド・バイオ・システムズ社(ABI社)製プロテインシーケンサー377Aを用いて決定した。結果は以下に示す通りであった。

N'-AsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAspValAla  
GlnAsnAsnTyrGly

Y<sub>a</sub>酵素の中央部ないしC末端領域のアミノ酸配列を解析するため、トリプシン消化により得られた試料を用いて同様の操作を行なった。その結果を以下に示す。

N'-LysTyrAlaTyrMetGlyGlyThrSerMetAlaThr

これらの解析結果よりイノシン法に基いて以下に示すオリゴヌクレオチドDNAをABI社製DNA合成装置381Aを用いて作製した。

A A T

プローブN: 5' CCATA TT TT TGIGCIACATCIGC 3'

G G C

A T

プローブC: 5' GTTCCICCCATATAIGC TA TT 3'

G C

上記プローブについては、 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-dATP(アマシム社製)及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)を用いて5'末端を<sup>32</sup>Pで標識した。

バチルス・エスピー Y株をNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10g/lを含むグイヨン培地(極東製薬社製)200mlを含む瓶口フラスコに接種し、30℃で終夜培養した。菌体約2gを取得し、サイトウーミウタの方法に準じて染色体DNAを2.8mg調製した。このDNA10μgをEcoRI(制限酵素はすべて宝酒造製)またはXbaIで消化後アガロースゲル電気泳動に供し、先に調製したプローブNを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、EcoRIで消化した染色体DNA断片では、約2.8KbpのDNA断片が、またXbaIで消化した断片では約1.2KbpのDNA断片がハイブリダイズした。さらに同操作をプローブCにつ

いても行なったところ、EcoRIで消化した染色体DNA断片では約2.0 KbpのDNA断片が、またXbaIで消化した断片では約1.2 KbpのDNA断片がハイブリダイズした。

#### クローニング

前述の染色体DNA 200  $\mu$ gをEcoRIで消化後アガロースゲル電気泳動に供し、約2.8 KbpのDNA断片をDEAEペーパー法を用いて20  $\mu$ g回収した。また約2.0 KbpのDNA断片についても同様の操作を行ない20  $\mu$ g回収した。染色体DNA 200  $\mu$ gをXbaIで消化し同様の操作を行ない約1.2 KbpのDNA断片を10  $\mu$ g回収した。pBR328(ペーリンガー社製)1  $\mu$ gをEcoRIで消化しアルカリフォスファターゼ(ペーリンガー社製)で脱磷酸後、フェノール抽出、すなわちフェノール-クロロホルム混液(1:1)を加え蛋白質変性を行ない、遠心分離後上清を回収する操作を行なった。さらにエタノール沈殿、すなわち0.1倍量の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)及び2倍量のエタノールを加え-80

で10分冷却後遠心分離によりDNAを回収する操作を行なった。このうち0.2  $\mu$ gと前述の約2.8 KbpのEcoRI断片0.05  $\mu$ gをライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌HB101株に導入した。生育した形質転換体500株よりアルカリ-SDS法を用いてDNAを抽出し、前記のプロープNを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果プロープNとハイブリダイズするプラスミドpYT101

(第2図)を見だし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。さらに約2 KbpのEcoRI断片についても前述のプロープCを用いて同様の操作を行ない、プロープCとハイブリダイズするプラスミドpYB2(第3図)を見だし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。また、pUC118(宝酒造社製)1  $\mu$ gをXbaIで消化しアルカリフォスファターゼで脱磷酸後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行なった。このうち0.2  $\mu$ gと前述の約1.2 KbpのXbaI断片0.05  $\mu$ gを

ライゲーションキットを用いて連結し、同様の操作をプロープNを用いて行なった。その結果プロープNとハイブリダイズするプラスミドpYX1(第4図)を見だし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。

#### 塩基配列の決定

取得したプラスミドpYT101、pYB2及びpYX1のYa酵素遺伝子の一部をpUC118及びpUC119(宝酒造社製)にサブクローニングし、宝酒造社製のマニュアルに従って1本鎖DNAを調製した。この1本鎖DNAと $\alpha$ -<sup>32</sup>S-dCTP(アマシヤム社製>37TBq/ $\mu$ mol)及びSEQUENASE(東洋紡社製)を用いて塩基配列の決定を行なった。この結果得られた塩基配列を第1図に示す。218 bpから2122 bpに存在するオープン・リーディングフレームより解明されたアミノ酸配列には、前述のYa酵素のプロモーションクエンサーによるアミノ酸配列の解析により確認されたアミノ酸配列と一致する配列が203残基目からと448残基目からに見いだせる。ま

たN末端が203残基目から始まることから、翻訳開始から202残基目までが前駆体領域であり、203残基目以降が成熟酵素を構成する領域と判断される。

#### 実施例 2

##### プロモーターの取得

バチルス・ライヘンホルミスLB8907株をブイヨン培地200 mlを含む坂口フラスコに植菌し、30℃で overnight 培養を行ない、菌体約1 gを取得し、サイトウ・ミウラの方法に準じて染色体DNAを2.0  $\mu$ g調製した。このうち50  $\mu$ gをEcoRIで消化し、フェノール処理、エタノール沈殿を行なった。pUC118 1  $\mu$ gをEcoRIで消化後アルカリフォスファターゼを用いて脱磷酸し、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない、このうち0.2  $\mu$ gと染色体DNAのEcoRI断片0.05  $\mu$ gをライゲーションキットを用いて連結し、この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生育した形質転換体を1%サツマイモデンプン(純正化学社製)を含む

L培地(バクトトリプトン10g/l、バクトイーストエキス5g/l、NaCl5g/l、バクトアガー20g/l、アンピシリン10mg/l、pH7.2)に接種し37℃で約40時間培養した。その結果形質転換体2000株より、デンプンを分解する、即ちアミラーゼ遺伝子を有する菌株を1株取得した。この菌株が保持するプラスミドpTA1(第5図)のプロモーター領域の塩基配列を実施例1に準じて決定し、その結果を第6図に示す。

#### Y<sub>a</sub>酵素を発現しうるプラスミドの作製

プラスミドpYB2 50μgをEcoRI及びSphIで消化しDEAEペーパー法を用いて約2KbpのDNA断片を回収した。そのうち0.05μgと、あらかじめEcoRI、SphIで消化しアルカリフォスファターゼを用いて脱磷酸処理後、フェノール処理、エタノール沈澱を行ない回収したpUC118 0.2μgをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生

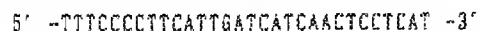
育した形質転換体の中から第7図に示すpUC118ESを保持する菌株を取得した。pYT101 50μgをEcoRIで消化しDEAEペーパー法を用いて約2.7KbpのDNA断片を回収した。そのうち0.05μgと、あらかじめEcoRIで消化しアルカリフォスファターゼを用いて脱磷酸処理後、フェノール処理、エタノール沈澱を行ない回収したpUC118ES 0.2μgをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入し、生育した形質転換体の中から第7図に示すpTB3を保持する菌株を取得した。

ABI社製DNA合成装置381A型を用いて下記に示すDNAプローブ(第1図の1181-1210bpに対応)を合成し、



宝酒造社製部位特異的変異法キットMutan-Kを用いて、pTB3のY<sub>a</sub>酵素のアミノ酸配列を変えずに塩基配列を改変し、EcoRI部位を消失させたプラスミドpTB3Eを取得した。さらに下記

に示すDNAプローブ(第1図の200-229bpに対応)を合成し、



同様にして塩基配列を改変し、Y<sub>a</sub>酵素翻訳開始コドン上流にBclI認識部位を作製したプラスミドpTB3EBを取得した。

また下記に示すDNAプローブを合成し、(第6図の216-245bpに対応)を合成し、



同様にしてpTA1の塩基配列を改変し、プロモーター領域下流にBclI認識部位を持つプラスミドpTA1Bを作製した。

pUC118 1μgをEcoRIで消化しアルカリフォスファターゼで脱磷酸後、フェノール処理、エタノール沈澱を行ない回収した。このうち0.2μgとあらかじめEcoRIで消化し、フェノール処理、エタノール沈澱を行い回収したpUB110 0.05μgをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生育した形

質転換体の中から第8図に示すプラスミドpUB81を保持する菌株を取得した。pTB3E 5μgをEcoRIで消化し、フェノール処理、エタノール沈澱を行なった後、クレノウフラグメント(宝酒造社製)を用いてDNA末端を平滑化した。さらにフェノール抽出、エタノール沈澱を行い、このうち0.2μgとSphIリンカー(ニューイングランドバイオラブ社製)50ngをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法を用いて大腸菌JM109株に導入した。生育した形質転換体のうちSphI認識部位が新たに作製されたプラスミドpTB3ES(第8図)を保持する菌株を取得した。pTB3ES 50μgをSphIで消化し、DEAEペーパー法を用いて4.6KbpのDNA断片を回収した。このDNA断片0.05μgと、SphIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈澱を行なったpUB81 0.2μgとをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をプロトプラスト法を用いてバチルス・サチルス1012株に導入した。生育し

た形質転換体のうち第8図に示すプラスミド pUB 8 Y を保持する菌株を取得した。

p T A 1 B 5 0  $\mu$ g を EcoR I 及び Bcl I で消化し、DEAE ペーパー法を用いて約 1 Kbp の DNA 断片を回収した。p T B 3 E B 1  $\mu$ g を EcoR I 及び Bcl I で消化しアルカリフォスファターゼで脱磷酸後、フェノール抽出、エタノール沈澱を行ない回収した。このうち 0.2  $\mu$ g と前記の p T A 1 B 由来の 1 Kbp DNA 断片 0.05  $\mu$ g とをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌 JM 109 株に導入した。生育した形質転換体のうち第9図に示すプラスミド p A Y 1 を保持する菌株を取得した。

p A Y 1 5 0  $\mu$ g を Sph I、さらにベクター側のフラグメントを分断するため Xmn I で消化し、DEAE ペーパー法を用いて約 3.5 Kb の DNA 断片を回収した。p U B 8 1 1  $\mu$ g を Sph I で消化しアルカリフォスファターゼで脱磷酸後、フェノール抽出、エタノール沈澱を行ない回収した。

を遊離させる酵素量を 1 アルカリプロテアーゼ単位 (APU) とした。各培養上清のアルカリプロテアーゼ活性の結果を表-1に示す。p U B 8 Y を保持する形質転換体のアルカリプロテアーゼの生産量は、p U B 1 1 0 を保持する形質転換体に比べて約 3 倍高く、また p U B 8 A を保持する形質転換体は、p U B 8 Y を保持する形質転換体に比べて約 30 倍の高い Y a 酵素の生産性を示した。

このうち 0.2  $\mu$ g と前述した p A Y 1 由来の 3.5 Kb DNA 断片 0.05  $\mu$ g をライゲーションキットを用いて連結した。この反応物を、プロトプラスト法を用いてバチルス・サチルス 1012 株に導入した。生育した形質転換体のうち第9図に示すプラスミド p U B 8 A を保持する菌株を取得した。

#### Y a 酵素の発現

p U B 1 1 0、p U B 8 Y、p U B 8 A を保持するバチルス・サチルス 1012 株の形質転換体を以下に組成を示す培地 (溶性澱粉 90 g/l、ポリペプトン S (大五栄養社製) 50 g/l、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g/l、MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0.2 g/l、硫酸カナマイシン 50 mg/l、pH 7.5) を含む坂口フラスコに接種し 33℃ にて 90 時間培養した。培養上清のアルカリプロテアーゼ活性はアンソニー・萩原の法 (Hagiwara, B., J. Biochem. 45, 188 (1958)) に準じて測定した。すなわち 35℃、pH 10.5 の条件下で 10 分間反応し、1 分間にチロシン 1  $\mu$ g 相当量

表 1

	APU/ml
Bacillus subtilis 1012 (pUB8Y)	850
(pUB8A)	25400
(pUB110)	320

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、Y a 酵素遺伝子の構造遺伝子領域の塩基配列およびそれに対応するアミノ酸配列である。

第2図は、Y a 酵素遺伝子のうち構造遺伝子の N 末端側及びプロモーター領域を保持するプラスミド p Y T 1 0 1 の制限酵素切断地図である。

第3図は、Y a 酵素遺伝子のうち構造遺伝子 C 末端側及びターミネーター領域を保持するプラスミド p Y B 2 の制限酵素切断地図である。

第4図は、Y a 酵素遺伝子のうち構造遺伝子中央部を保持するプラスミド p Y X 1 の制限酵素切



断地図である。

第5図は、バチルス・ライヘンホルミスLB8907より単離したアミラーゼ遺伝子を保持するプラスミドpTA1の制限酵素切断地図である。

第6図は、バチルス・ライヘンホルミスLB8907より単離したアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域近傍の塩基配列およびそれに対応するアミノ酸配列である。

第7図は、pYT101とpYB2のY<sub>a</sub>酵素遺伝子の領域を連結したプラスミドpTB3の作製行程図である。

第8図は、pTB3のうちY<sub>a</sub>酵素遺伝子の領域をバチルス属細菌で複製可能なプラスミドpUB110に連結したプラスミドpUB8Yの作製行程図である。

第9図は、pTB3EBのY<sub>a</sub>酵素遺伝子のプロモーター領域をpTA1Bのアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に交換し、バチルス属細菌で複製可能なプラスミドpUB110に連結したプラスミドpUB8Aの作製行程図である。

Ba : BamH I      Bc : Bcl I  
Bg : Bgl I I      C : Cla I  
E : EcoR I      H : Hinc I I  
K : Kpn I      P : Pst I  
S : Sph I      Xb : Xba I  
Xm : Xma I  
AP : アルカリフォスファターゼ  
MCS : マルチクローニングサイト  
A<sup>r</sup> : アンピシリン耐性遺伝子  
T<sup>c</sup> : テトラサイクリン耐性遺伝子  
ori : 複製領域。

# 図面の傍書

## 第1図 Y<sub>a</sub>酵素遺伝子塩基配列とアミノ酸配列 (その1)

```

GCATCAGTACATTTGGCTAAAGCTCTAGGCTCTTTCTTGAAGCAACATGGCTTTT 64
1
TTCTTTAACTAATGCTGATCTTTCTTTCCATTGGGAATAGCAGGAAAGCATTCCTATGC 65
85
AATGTAATAGCTGAATTTTCCCAATACCGGAGAGGTTTCTCTATGGTATCTTATTATGATG 130
131
138
145
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

```

図面の添書

第 1 図 Y 酵素遺伝子 塩基配列 と アミノ酸配列 (その2)

148	ProGlnGlnGlnThrLysGlyAlaSerGlnGlnGlnAlaValIleLeuLeuGlnThrCysHisGly	189
150	CTCTGACCTTTTACGAGAGCTGCTTCCCTGCTTCTTCAGAGCGTTATTTAAATACACAGACAGCA	228
152	458	228
154	AsnLysAsnGlyProThrGlyLeuAspGlnIleValLeuThrAlaValLeuLeuLeuLeuLeuLeu	267
156	AATAAAGCATGAATTTACGCTTTAGCTGAGCATCTTCAATATGCTTGCATATATGATGCTCTT	306
158	724	306
160	192	213
162	TyrlleSerProLysProGlnIleValLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeu	252
164	214	252
166	ValIleGlnAspGlnThrGlyLeuThrGlyGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGln	291
168	GTTCACAGCAATTTACGCTTTAGCTGAGCATCTTCAATATGCTTGCATATATGATGCTCTT	330
170	857	330
172	238	357
174	AsnLysAsnGlyProThrGlyLeuThrGlyGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGln	396
176	GAATAGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGAT	435
178	873	435
180	258	462
182	LeuIleArgThrAsnGlnIleSerAspProGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGln	501
184	TTTAAAGCAATTTACGCTTTAGCTGAGCATCTTCAATATGCTTGCATATATGATGCTCTT	540
186	889	540
188	280	567
190	GlyAsnAlaLeuGlnGlyProThrGlyGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGln	606
192	GCTATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGAT	645
194	1055	645
196	302	672
198	SerGlnGlyGlnGlyProThrGlyGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGlnGln	711
200	AGCGAGGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGAT	750
202	1126	750
204	324	777
206	AlaLysGlnIleThrAsnSerProGlyAlaProGlyAlaProGlyAlaProGlyAlaProGlyAla	816
208	CGAGCATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGAT	855
210	1187	855
212	346	882
214	ValAspGlnGlyAlaValAspGlnGlyAlaValAspGlnGlyAlaValAspGlnGlyAlaValAsp	921
216	GCTATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGAT	960
218	1253	960

図面の添書

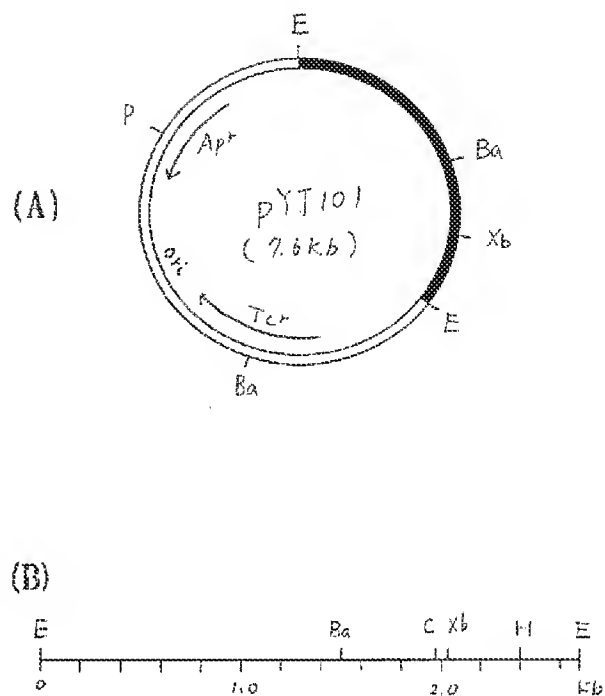
第 1 図 Y 酵素遺伝子 塩基配列 と アミノ酸配列 (その3)

368	SerGlyThrIleSerAlaProGlyThrAlaValLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeu	389
370	TGAGGAGCATTTAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	428
372	1319	428
374	390	455
376	AsnProSerThrGlySerIleLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeu	494
378	CGCCAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	533
380	1385	533
382	412	560
384	ThrArgAspGlyAlaIleLysProGlnValThrAlaProGlyThrAlaProGlyThrAlaProGlyThr	600
386	AGCGAGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	639
388	1463	639
390	440	666
392	SerLeuAlaProSerSerProThrAlaValLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeu	705
394	TCTTACGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	744
396	1487	744
398	458	771
400	SerProAlaThrProIleValAlaGlyAlaValAlaGlyAlaValAlaGlyAlaValAlaGlyAla	810
402	TCTTACGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	849
404	1503	849
406	478	876
408	GlyIleThrProLysProGlnValLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeu	915
410	GCTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	954
412	1649	954
414	500	981
416	GlyIleProSerGlyAspGlnGlyIleValLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeu	1020
418	GCTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	1059
420	1715	1059
422	522	1086
424	ValAspGlnAlaThrAlaValLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeu	1125
426	GCTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	1164
428	1761	1164
430	LysProLeuLysIleSerLeuValThrAlaProGlyThrAlaProGlyThrAlaProGlyThrAla	1203
432	AAAGCTTAAAGATTTCTGAGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	1242
434	1847	1242
436	586	1269
438	ValAspAlaLeuAspGlnGlyIleThrAlaProGlnGlyIleThrAlaProGlnGlyIleThrAlaPro	1308
440	GCTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	1347
442	1913	1347

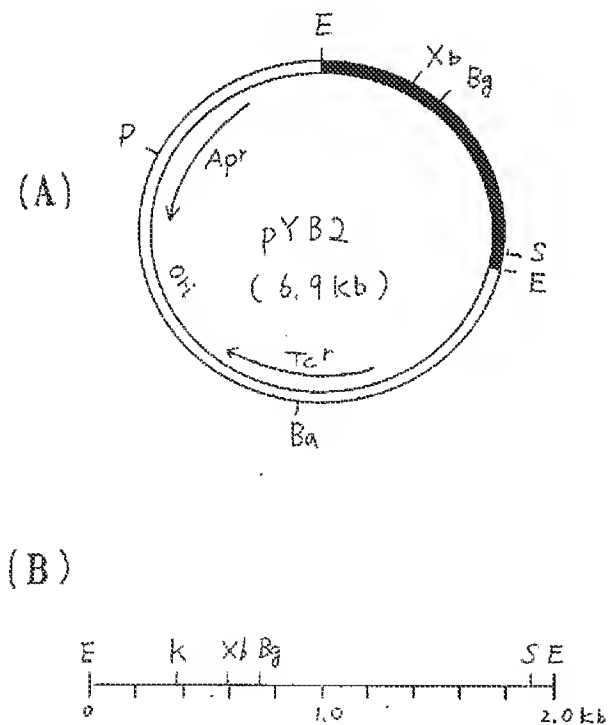
図面の浄書

第 1 図 Y 酵素遺伝子 塩基配列とアミノ酸配列 (その4)

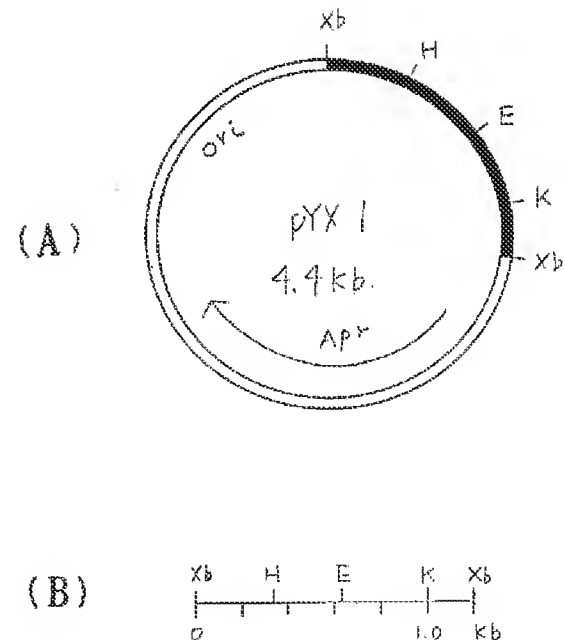
588	TyrProTyrAspAsnAsnTrpAspGlyArgAsnValGluAsnValPheIleAsnAlaProGln	609
1979	TATCTTATGATATTAATCTGGCATCTCCACACAATGTTGAGACCTATTATTAAAGCTCCGCA	2044
610	SerGlyThrTyrIleIleGluValGlnAlaTyrAsnValProSerGlyProGlnArgPheSerIleu	631
2045	TCTGGACGTAATATATTGAGCTTCAGCGTATATGTACCATCTGGCCACAGCGTTTCTCCTA	2110
632	AlaIleValHis	635
2111	GCTATCGTACATTATATATTTTATATCATGAGAAATAAGGATTTTCCCTTAGTTTTCCTCA	2178
2177	TTTGTTCACCATATATATTTTTCACGACTATGGAAGCTA	



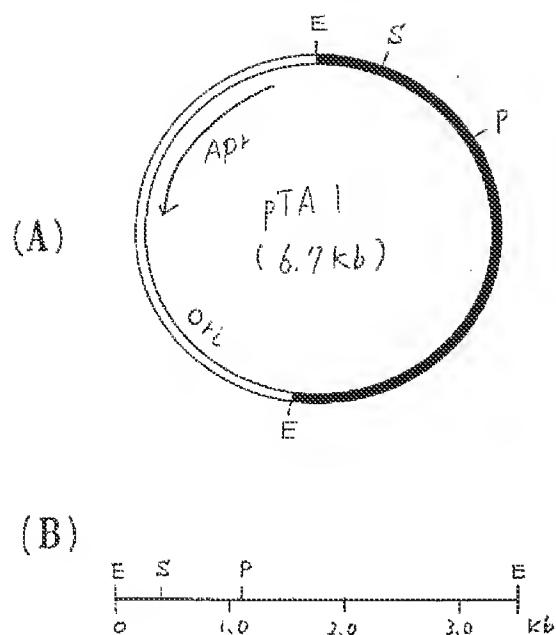
第 2 図



第 3 図



第 4 図



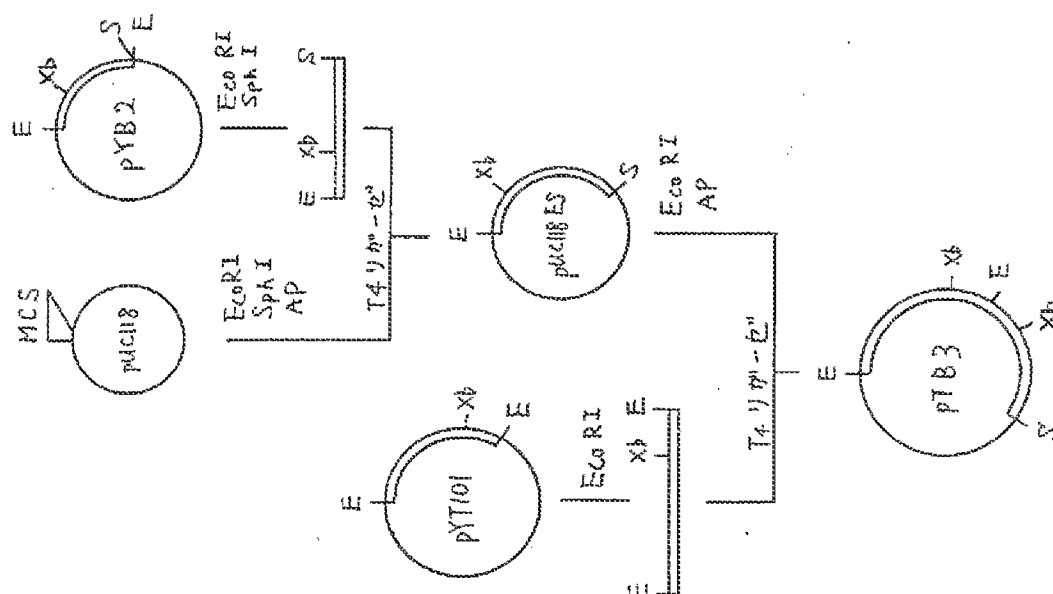
第 6 図 アミラーゼ・プロモーター遺伝子の塩基配列

```

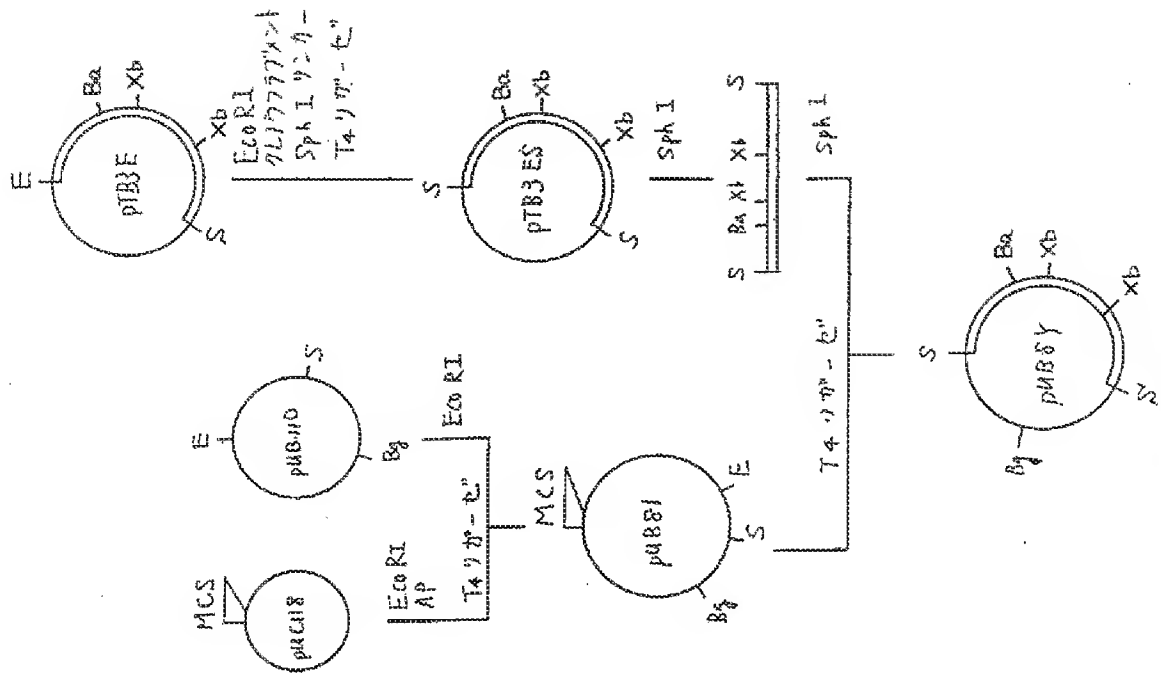
CAACGTCGCAGATGCTGCTGAAGACATTATTAAGCTGAAAGCAAAAGGCTATCAATT
1 80
CGTAACGTGATCTCAGCTTGAAGCAAGTGAAGAACCAGACAGGCTATTCAATAAATGACTA
81 120
GAAAGCCCATATCGCTTTTCTTTTGAAGAAAATATAGGCAAAATCGTATTGTTAAAA
121 160
1 2
MetLys
ATTCTGAATATTTATACAATATCATATGTTTCACATTGAAAGGGGACGAGAATCATGAAA
181 240
3 33
GlnGlnLysArgLysTyrAlaArgLeuLeuProLeuLeuPheAlaLeuIlePheLeuLeu
CAACAAAAACGGCTTTACGCCGATTGCTGCCGCTGTTATTTGGGCTCATCTTCTTGCTC
241 300
34 37
ProHisSerAla
CCTCATTCTGCA
301 312

```

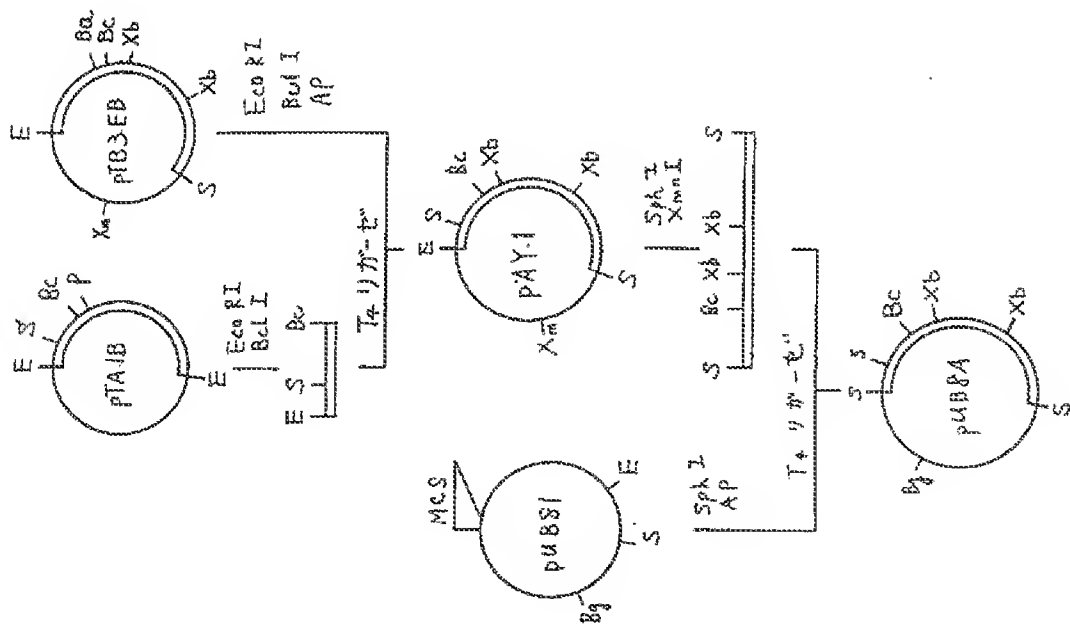
第 5 図



第 7 図



第 8 図



第 9 図

手続補正書(方式)

平成 3. 8. 27 月 日

特許庁長官 樋 松 敏 殿

1. 事件の表示 平成2年特許願第327110号

2. 発明の名称 アルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>酵素をコードするDNA及び該DNAを用いたアルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名 称 (676) ライオン株式会社

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号  
電話(代) 3211-8741

氏 名 (5995) 井理士 中 村

5. 補正命令の日付 平成3年3月12日

6. 補正の対象 図 面

7. 補正の内容

図面の第1図の(その2)及び(その4)を別紙の通り補正する。

(1) 明細書の以下の箇所を以下の通り補正する。

頁	行	誤	正
6	下から4	計算	生産
11	10	染色体菌	染色体
15	下から2	Subtilis	subtilis
16	12	コーンステイ ープリカー	コーンステイ ンプリカー
21	下から 4~3	プロネンシー クエンサー	プロテインシー クエンサー

(2) 図面の第1図(その2)第4図(その4)、  
第6図及び第9図を別紙の通り補正する。

手続補正書

平成 3. 8. 27 年 月 日

特許庁長官 樋 松 敏 殿

1. 事件の表示 平成2年特許願第327110号

2. 発明の名称 アルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>酵素をコードするDNA及び該DNAを用いたアルカリプロテアーゼY<sub>a</sub>の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名 称 (676) ライオン株式会社

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号  
電話(代) 3211-8741

氏 名 (5995) 井理士 中 村

5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄  
図 面

7. 補正の内容

第1 図 Y 酵素遺伝子 塩基配列とアミノ酸配列 (その2)

148	169
ProGlnLeuLeuThrLysGlyAlaSerGlnLeuValGlnAlaValIleLeuAsnThrLysHisGlu	
CCTGAGCTTTTAAAGAAAGCTGCTCCAGCTTGTTCAGCGCTTAATTTTAAATACAAACACCAA	
658	724
170	191
AsnLysAsnMetLysPheThrGlyLeuAspGluIleValGlnTyrAlaAlaAsnAsnAspValLeu	
AAATAAATCATGAATTTTACCGGTTAGATGAGATCGCTTCATATCTTGCATTAATCATCTGCTT	
724	780
182	213
TyrIleSerProLysProGlnTyrGlnLeuPheLysAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAsp	
TATATATCACCAGAGCCCGAGTATGACCTAATGAAATCATGTAGCAGAGCGATACATAAGCTGAT	
791	856
214	235
ValAlaGlnAsnAsnTyrGlyLeuTyrGlyGlnGlnLeuValAlaValAlaAspThrGlyLeu	
GTTCCAGAAACAAATTACGGATTATATGCAACCTCAACTAATTCACACTAGCGGACACAGCTTA	
857	922
236	257
AspThrGlyArgAsnAspSerSerMetHisGluAlaPheArgGlyLysIleThrAlaLeuTyrAla	
GATACAGCTGCTAGCATACTCTTATGATGAGCATTCGCCCGGAAATATCACGCTCTTTACGGC	
923	988
258	279
LeuGlyArgThrAsnAsnAlaSerAsnProAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlnGlySerValLeu	
TTAGGAGAACTAATTAATGCCAGTGTCCGAATGCCATGCCACACATGTACGAGGTTCTGTACTT	
989	1054
280	301
GlyAsnAlaLeuAsnLysGlyMetAlaProGlnAlaAsnLeuValPheGlnSerIlePheLysSer	
GCTAATGCTTTAAATAAGGAATGCTCCGCAGCTAACTTACTCTTCCAACTATATATGATAGC	
1055	1125
302	323
SerGlyGlyLeuGlyGlyLeuProSerAsnLeuAsnThrLeuPheSerGlnAlaTrpAsnAlaGly	
ACCGAGGAGTTAGCTGGCTTACCATCCACACTTAATAATGCTTATTTAGTCAACCTTCGAAATGCTGA	
1126	1185
324	345
AlaArgIleHisThrAsnSerTrpGlyAlaProValAsnGlyAlaTyrThrAlaAsnSerArgGln	
GCAAGATTCATCTAATCTTCCGGAGCCGCCGCTMAATGGAGGCTACACTCTTAATCTGAGACAA	
1187	1252
346	367
ValAspGlnTyrValArgAsnAsnAspPheThrValLeuPheAlaAlaGlyAsnGlnGlyProAsn	
GTGGATGACTATGTTCCAAATATATGATGAGCTTCTTTTCCACTTGGTAAATGAGGCTCTTAAT	
1253	1318

第1 図 Y 酵素遺伝子 塩基配列とアミノ酸配列 (その1)

GGATCCACTACATTTTGGTAAAGTCTCTAGCGCTTCTTCTTCAAGAAACAATGGCTTTTT	
1	64
TTGTTTTAACTAATGTGCATTTCTTTTCATTCCGAAATACGAGGAAAGCAATGCTGTATAC	
65	130
AATGTAATAGACTCAATTTTCCAAATACCGAGAGGTTTCTCTATGCTATTTTATTAAATGATG	
131	196
1	15
MetLysGlyLysLysArgValValIleuSerValValAlaIleSerAla	
AACATGAGCAGTTTCACGAGAAATCAGCGGAAAGACGATAGTCTATCATCTAGTGTGTGCT	
197	262
16	37
AlaIleLeuAlaSerValIleValSerSerProThrSerGlyAlaAspPheGlnValAsnPheAsn	
GCATCTTACGCTCATATATGTTAGTTTCCAACTATTCAGGCAATTTTCAAGTGAATTTTAAAT	
263	328
38	59
GlyValLysSerLeuGluAsnAlaSerLeuValLysProIleSerSerGlyGluAlaSerPheLeu	
GGTGTGAAAAGTTTAGAAATGCTACTTTGCTTAAAGCATAGTAGCGCTCAGGCACTCTTTCTA	
329	394
60	81
ValAspThrGluAsnIleAsnIleProLysGlyIleGlnLysLysLeuGluAlaValGlnLysAsp	
GTAGATACCGAAATATTAATATTCTTAAGCTATTTCAAAGAGCTAGAACCCAGTACAGAGGAT	
395	460
82	103
AsnGluLeuTyrIleValGlnPheThrGlyProIleSerGluGlnGlnArgLysGlyLeuGluSer	
AACAACTCTACATCTTCAATTTACTGACCAATTTACAGAGGAGAGCGAAGAGCATTTAGAGTCT	
461	526
104	125
LeuGlyValSerIleLeuAspTyrValProAspTyrAlaPheIleValGlnTyrSerGlyAlaThr	
CTAGAGTATCGATTCTAGATTATGTTCCAGATATGCTTTTATTGCTTCACTATAGTGTGTCTACA	
527	592
126	147
LysAsnIleSerThrLeuHisSerValGluAsnValIleProPheLeuProLeuTyrLysIleAsp	
AAAAATATAGACTTTTACATTCTCTGTCAGCAAGCAGAACCAATTTTACCATTAATATATGAATGAT	
593	658

第 1 図 Y 酵素遺伝子 塩基配列とアミノ酸配列 (その 3)

388	SerGlyThrIleSerAlaProGlyThrAlaLysAsnAlaIleThrValGlyAlaThrGluAsnTyr	398
1319	TCCGCAACAATTAGTGGTCCAGGTACAGCGAAGAAATGCTATTACGGTCGGCCCAACGGAAACTAT	1384
390	ArgProSerPheGlySerIleAlaAspAsnProAsnHisIleAlaIlePheSerSerArgGlyAla	411
1319	CCGCCAAGCTTCGGTTCGATACGATACCAATATATATTCACAAATTTTCATCCAGCAGAGCT	1384
390	ThrArgAspGlyArgIleLysProAsnValIleAlaProGlyThrPheIleLeuSerAlaArgSer	411
1319	ACGAGGATGACGATTAAGCTGACGTACAGCTCCGGACATTTATTTATCAGCAGCTTCT	1384
390	SerLeuAlaProAspSerSerPheIleAlaAsnTyrAsnSerLysTyrAlaTyrPheIleGlyThr	411
1319	TCCTAGCTCCAGACTCTGCTTTGGGCAATATACAGTAAATACGCTATATGCGCGTACC	1384
390	SerPheAlaThrProIleValAlaGlyAsnValAlaGlnLeuArgGluHisPheIleLysAsnArg	411
1319	TCCATGGCGCAGCTTATGTTCCAGGAAATGCGCCCAATTCAGTACCATTTTATAAATAACA	1384
390	GlyIleThrProLysProSerLeuIleLysAlaAlaLeuIleAlaGlyAlaThrAspValGlyLeu	411
1319	GGTATTACTCTAAAGCTCTTTTATAAAGCTGCTTATTCCTGCTGCTACTGCTGCTGCTTTA	1384
390	GlyTyrProSerGlyAspGlnGlyTyrGlyArgValThrLeuAspLysSerLeuAsnValAlaTyr	411
1319	GCATATCTAGTCTGCTGACCAAGCTGCGGCGCTGCTTACTCTACATAAATGCTTAAATCTAGCTAT	1384
390	ValAsnGluAlaThrAlaLeuAlaThrGlyGlnLysAlaThrTyrSerPheGlnAlaGlnAlaGly	411
1319	GTCATGCAAGCAACTGCTATTCACCAAGCAGCAAAAAGCAAGCTATTTCCTCCAGCAGCAAGCTGCT	1384
390	LysProLeuLysIleSerLeuValIleThrAspAlaProGlySerThrAlaIleSerTyrThrLeu	411
1319	AAACCTTTAAATCTCTTACTATATGACATGCTCTCCGAACTACAGTACAGTCTTTATACACTA	1384
390	ValAsnAspIleAsnLeuValIleThrAlaProAsnGlyGlnLysTyrValGlyAsnAspPheSer	411
1319	CTTAATCATTTACATCTAGTTATTTCTGCTCCGATTCGACATGCAATATGCTAGCAATCATTTACT	1384
390		1913

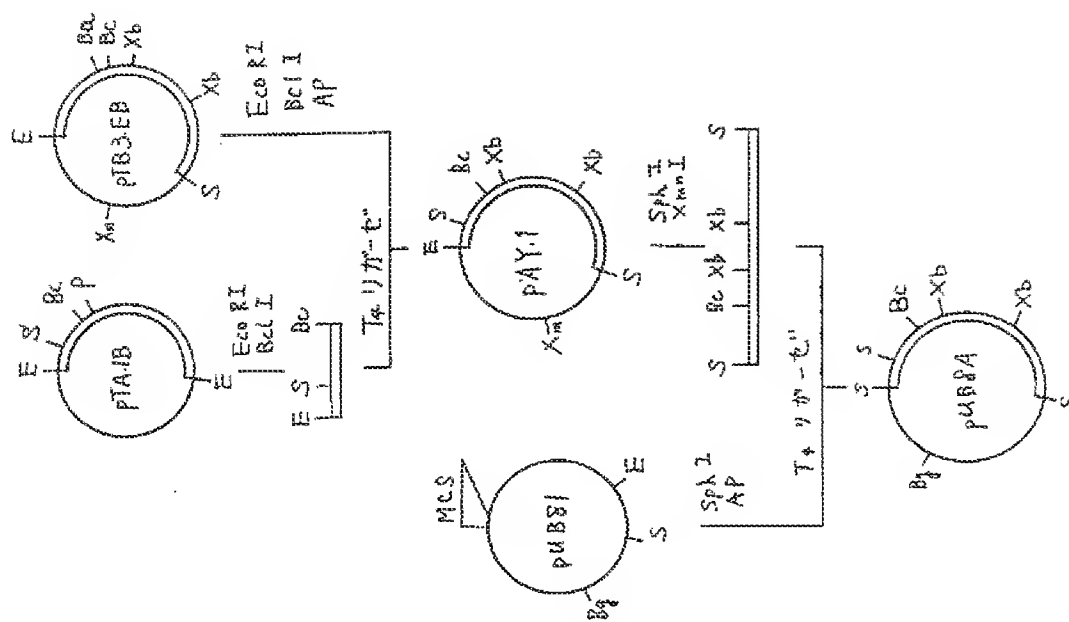
第 1 図 Y 酵素遺伝子 塩基配列とアミノ酸配列 (その 4)

588	TyrProTyrAspAsnAsnTyrAspGlyArgAsnAsnValGluAsnValPheIleAsnAlaProGln	609
1979	TATCCTTATGATATTAATTCGGATGCTCCCAACAAATGTTGACAGACCTATTTATTAACGCTCCCA	2044
610	SerGlyThrTyrIleIleGluValGlnAlaTyrAsnValProSerGlyProGlnArgPheSerLeu	631
1979	TCTCGAAGCTATATTAATTCAGCTTCAGCGCTATAATGTAACATCTCGCCCAACAGCGCTTCTCACTA	2044
610	AlaIleValHis	631
1979	GCTATGCTACATTAATTTTATTAATGACAAAAAAGTAAAGCAATTTTCACTTACTTTTCTCAT	2044
610	ThrArgAspGlyArgIleLysProAsnValIleAlaProGlyThrPheIleLeuSerAlaArgSer	631
1979	TTTCTGACGATTAATTTTTCACGACGCTATGCAATTTTCACTTACTTTTCTCAT	2044
610	ValAsnGluAlaThrAlaLeuAlaThrGlyGlnLysAlaThrTyrSerPheGlnAlaGlnAlaGly	631
1979	ATTCCTGATTTTATACATATCATATGCTTTTCAATTTGAAAGCGGACGACATCATGAA	2044
610	GlnGlnLysArgLysTyrAlaArgLeuLeuProLeuLeuPheAlaLeuIlePheLeuLeu	631
1979	CACCAAAACGGCTTTAGCGCGGATTTGCTGCGCTCTTATTTTGGCTCATCTTCTTCTTC	2044
610	ProHisSerAla	631
1979	CCTCATTCGCA	631
610		312

第 6 図 アミラーゼ・プロモーター遺伝子の塩基配列

1	CACCTGCCGACATGCTGCTGACGACATTTATTAAGCTGAAAGCAAGGCTATGCAAT	60
61	GGTAACTGATCTCAGCTTGACAGAGTGAAGAGCAGACAGGCTATTGAAATATGACTA	120
121	GAAAGCCCATATCGCTTTCTTTTGGACAAATATAGCGAAATGCTATTTGTTAATA	180
181	ATTCCTGATTTTATACATATCATATGCTTTTCAATTTGAAAGCGGACGACATCATGAA	240
241	GlnGlnLysArgLysTyrAlaArgLeuLeuProLeuLeuPheAlaLeuIlePheLeuLeu	300
301	CCTCATTCGCA	312





第 9 圖